

VACCINURI ARNM: ISTORIC, NECESITĂȚI, DOMENII DE UTILIZARE**MRNA VACCINES: HISTORY, NEEDS, AREAS OF USE****Elena Mihaela Constantinescu, Andreea Ioana Chivaran, Cristian-Adrian Constantinescu,**

Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania, Brașov

Autor corespondent: **Cristian-Adrian Constantinescu**, email **constantinesco@gmail.com****Abstract:**

Vaccine production techniques have progressed and what was once the theoretical evolution of molecular biology technologies could be put into practice today by existing subunit vaccines, which use peptides, or messenger RNA (mRNA). In the event of a devastating pandemic, obtaining vaccines in a short time to stop this evolution is a priority, through the sustained effort of researchers supported by a huge financial effort. This goal is achieved faster because these vaccines had a history, unfinished studies in different phases of evolution.

Rezumat:

Tehnicile de producere ale vaccinurilor au progresat și evoluția inițial teoretică a tehnologiilor biologiei moleculare a putut fi pusă în practică, în prezent existând vaccinuri subunitare care utilizează peptide, sau ARN mesager (ARNm).

În situația unei pandemii devastatoare, obținerea într-un timp cât mai scurt a unor vaccinuri care să stopeze această evoluție este prioritară, fiind necesar un efort financiar uriaș. Acest scop este atins cu atât mai repede cu cât aceste vaccinuri aveau în istoric studii în diferite faze de evoluție, dar nefinalizate

Key-words: mRNA vaccines, history, efficacy, areas of use**Cuvinte cheie:** vaccinuri ARNm, istoric, eficiență, domenii de utilizare**Introducere**

Abordarea medicală ideală pentru prevenirea și controlul bolilor infecțioase este vaccinarea, administrarea vaccinurilor de-a lungul timpului salvând milioane de vieți și în același timp economisind sume impresionante prin evitarea apariției bolilor respective. Utilizarea vaccinurilor vii atenuate sau inactivate pe scară largă a condus în timp la controlul și eradicarea multor boli infecțioase grave la om: poliomielita, rujeola, parotidita epidemică, rubeola, variola, variola. Succesul impresionant al vaccinurilor în prevenirea apariției bolilor infecțioase a determinat cercetătorii să-și îndrepte atenția și către posibilitatea utilizării acestora nu numai pentru prevenirea apariției diferitelor forme de cancer, dar și pentru tratarea lor (*Lents MP, 2018; Cuzick J, 2017*).

Cercetările au elucidat mecanismele prin care vaccinurile declanșează răspunsul imun, astfel administrarea vaccinurilor inactivate, determină protecție prin intermediul anticorpilor specifici antigenului, vaccinurile vii atenuate

provoacă răspunsuri imune celulare puternice, esențiale pentru eradicarea multor agenți patogeni intracelulari.

Vaccinurile pot prezenta și aspecte indzirabile, de exemplu în cazul celor inactivate, prezența unor mutații la nivelul antigenelor de suprafață ai agenților patogeni putând să conducă la scăderea eficacității acestora. În situația vaccinurilor vii atenuate apare posibilitatea de a provoca boli la indivizii imuno-compromiși și posibilitatea revenirii la o formă virulentă prin pasaje repetate, sau a recombinării cu tulpini de tip sălbatic circulante (*Li J, 2009; Zhou B, 2016*). Vaccinurile subunitare și peptidice sunt mai puțin eficiente în obținerea unui răspuns imun CD8 + robust, important mai ales în situația agenților patogeni intracelulari, virusuri și a unor bacterii (*Baitsch L, 2011; Li J, 2014*).

Vaccinarea cu vaccinuri pe bază de acid nucleic imită infecția sau imunizarea cu microorganismele vii și stimulează intens răspunsul imunitar al limfocitelor T precum și răspunsul imunitar al celulelor B (*Pardi N, 2018; Hollister K,*

2014). Mai mult, fabricarea vaccinului pe bază de acid nucleic este sigură și economisește timp, evitând riscul de contaminare cu agenți infecțioși vii.

Istoricul vaccinurilor ARNm

Deși vaccinurile cu ARNm au fost testate pentru prima dată la începutul anilor 1990, acestea nu au fost inițial utilizate pe scară largă din cauza fragilității mari (păstrarea lor necesitând temperaturi extrem de scăzute, inaccesibile), precum și a capacității de producție la scară mică. În anul 1995 Ross și colaboratorii au publicat un articol în care propuneau soluții pentru rezolvarea acestor inconveniente (Ross J, 1995).

La începutul anilor 1990 cercetătoarea Katalin Kariko de la Universitatea Pennsylvania a început să testeze tehnologia ARNm ca o formă de terapie genică. În ultimii 15 ani aceasta a făcut echipă cu dr. Drew Weissman, un expert în boli infecțioase de la Universitatea Penn, pentru a aplica tehnologia ARNm în dezvoltarea unor vaccinuri care ar putea fi utile pentru combaterea rapidă a unei posibile pandemii. Practic ambii se gândeau că această tehnologie poate să fie utilizată în situația unei pandemii de gripă. Pentru producerea unui vaccin gripal rapid cu tehnica ARNm ai nevoie doar de secvența genetică a virusului. Folosind metodele tradiționale, trebuie să izolezi virusul, să îl dezactivezi și să îl purifici, procedee care necesită timp.

Timpul a fost un inamic reductabil și în situația pandemiei cu coronavirus de aceea a doua zi după ce cercetătorii chinezii au dezvoltat secvența genetică a virusului SARS-CoV-2 Weissman, Kariko și alții au pus în practică ideea dezvoltării unui vaccin ARNm prin administrarea acestuia la animale

În demersurile lor Weissman, alături de Kariko a ajutat la dezvoltarea vaccinului anti-Covid al Pfizer/BioNTech. S-au bazat și pe cele 5 studii clinice în faza 1 care erau deja începute înainte de apariția COVID. (Kariko K, 2011; Weissman B, 2013).

Studiile au inclus vaccinuri ARNm produse sintetic printr-o reacție de transcripție enzimatică acelulară. Reacția de transcriere in vitro include mai multe elemente: un ADN plasmid liniar care codifică vaccinul ARNm ca șablon, o ARN polimerază recombinantă și

trifosfații nucleozidici ca elemente esențiale. De reținut este faptul că studiile derulate au demonstrat că aceste vaccinuri nu se pot integra potențial în genomul gazdă și vor fi degradate în mod natural în timpul procesului de exprimare a antigenului.

Vaccinurile ARNm au fost raportate a fi eficiente pentru prima dată de Wolff și colab. (Wolff JA, 1990)

Eficiența vaccinurilor ARNm

În stabilirea eficienței unui vaccin ARNm sunt luate în considerare două caracteristici. Acestea sunt stabilitatea produsului și capacitatea translațională a ARNm (Weissman B, 2015; Sahin U, 2014). În procesul translației, puritatea ARNm determină stabilitatea și randamentul sintezei proteice (Probst J, 2007). Contaminarea cu fracții ARN aberante rezultate în urma activității ARN-polimerazei duce la inhibarea procesului translațional și degradarea ARNm celular și ribozomal, astfel scăzând expresia proteică, prin întreruperea mecanismului translațional. Procesul translațional poate crește semnificativ prin eliminarea fracțiunilor de ARN aberant, aceasta realizându-se (Kariko K, 2011) prin procese de purificare. În acest scop s-a recurs la utilizarea clorurii de litiu (LiCl), dar fără rezultate mulțumitoare. În schimb metodele de purificare prin cromatografie lichidă cu proteine rapide (FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography) sau cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), pot fi utilizate pentru a elimina compușii în exces și pentru a produce ARNm pe o scară largă, respectând totodată reglementările impuse de către agențiile care controlează autorizarea și licențierea producerii și vânzării de medicamente (Good manufacturing practice) (Kariko K, 2011; Probst J, 2007; Pascolo S, 2006; Weissman B, 2013).

S-a demonstrat că vaccinurile care folosesc tehnica mARNm sunt eficiente în ceea ce privește expresia antigenică. Un aspect secundar care a apărut și care a trebuit luat în calcul, a fost că în acest proces structurile secvențiale și secundare formate de ARNm pot fi recunoscute de către o serie de receptori ai imunității înnăscute și aceasta ar putea duce la inhibarea procesului translațional și a producției proteice. Datorită progreselor făcute în înțele-

gereea biologiei ARN, în prezent există mai multe metode care pot fi folosite pentru creșterea potenței vaccinurilor ce folosesc tehnica ARNm, cele mai importante fiind încorporarea de nucleozide modificate și optimizarea codonilor, care eficientizează procesul translațional (Anderson BR, 2010; Andries O, 2015; Meyer M, 2018; Van Gulck ER, 2006; Pardi N, 2013; Pardi N, 2017).

Condițiile speciale de transport și depozitare (temperaturi scăzute) a vaccinurilor ARNm pot constitui o sursă de erori medicale, de aceea producerea unor vaccinuri termostabile a constituit o preocupare permanentă a cercetătorilor. Astfel, Alberer a demonstrat stabilitatea vaccinului ARNm liofilizat la 5-25⁰C pentru 36 de luni și la 40⁰C pentru 6 luni (Alberer M, 2017). Stitz a arătat că vaccinul ARNm antirabic încapsulat (încapsularea ARNm prevenind degradarea produsă de RN-ază.) rezistă la temperaturi oscilante cuprinse între 4 și 56⁰C pentru 20 de cicluri și la expunerea de 70⁰C, păstrându-și imunogenitatea (Stitz L, 2017).

Utilizarea vaccinurilor ARNm în profilaxia unor boli infecțioase

În ultimii 20 de ani, vaccinurile ARNm au fost studiate în scopul prevenirii și tratării bolilor infecțioase și oncologice (Pardi N, 2018; Fiedler K, 2016). Scopul utilizării acestora în domeniul oncologiei este majoritar terapeutic și se poate face prin mecanismul de inducere a expresiei antigenelor asociate tumorii pentru stimularea răspunsului imun mediat celular (Coulie PG, 2014). Prevenția apariției bolilor infecțioase se poate realiza prin inducerea unui răspuns imun umoral cât și T celular (Pardi N, 2018; Iavarone CT, 2017).

Studiile clinice au demonstrat că vaccinurile bazate pe tehnica ARNm prezintă numeroase avantaje: sunt neinfecțioase, nu se pot integra în ADN-ul persoanei receptoare, beneficiază de o degradare naturală, producție rapidă și scalabilă, stimulează răspunsul imun înăscut, induc răspunsul imun al celulelor T și B, nu necesită medii de cultură, producerea lor fiind simplă și rapidă în comparație cu vaccinurile clasice și constituie o soluție viabilă, rapidă, salvatoare de vieți omenești într-un timp record (Rauch S, 2018)

Tehnica ARNm este folosită atât în prevenția bolilor infecțioase la animale cât și la

om. La animale a fost demonstrată eficiența vaccinurilor împotriva virusului rabic, a virusului Powassan dar și a altor virusuri (Pulido MR, 2010; Saxena S, 2009; VanBlargan LA, 2018).

La om dovedirea eficacității în profilaxie a vaccinurilor ARNm a fost demonstrată în cazul gripei, rabiei, infecției cu cytomegalovirusurile (CMV), Chikungunya, herpesul genital, virusul Zika, virusul respirator sincițial.

Utilizarea vaccinurilor ARNm în privința profilaxiei gripei a avut în vedere tulpinile A H3N2, A H7N9 și A H10N8.

În ultimul timp mai mulți cercetători au demonstrat inducerea unui răspuns imun protectiv mai mare împotriva virusului gripal (prin evitarea producerii antigenelor necorespunzătoare), în situația utilizării vaccinurilor ARNm comparativ cu cele în care antigenul este produs prin cultivare pe medii celulare cu ou (Fleeton MN, 2001; Magini D, 2016; Chahal JS, 2016; Brazzoli M, 2016; Scorza FB, 2018). Un exemplu îl constituie tulpina H3N2 a virusului gripal produsă pe culturi celulare de ou când are loc pierderea sitului de glicozilare indusă de o mutație la nivelul hemaglutininei, ceea ce conduce la un răspuns imun insuficient împotriva acestei tulpini. (Zost SJ, 2017; Wu NC, 2017)

Virusul gripal A (H7N9) a cauzat de la descoperirea lui în anul 2013 și până în prezent 1.567 de infecții diagnosticate și 615 decese, majoritatea pe teritoriul Chinei. (WHO, 2021) Diversitatea genetică a acestor tulpini care cauzează gripa aviară ridică importante probleme de sănătate în comunitățile asiatice. (Su S, 2015)

În contextul apariției numeroaselor variante de virus gripal, între anii 2015 și 2018 au fost derulate două studii clinice de fază I care au cercetat două formule de vaccin ARNm împotriva virusului gripal A, tulpinile H10N8 și H7N9, pe 201 respectiv pe 156 de adulți sănătoși, în scop profilactic. Rezultatele studiilor au arătat că primele vaccinuri ARNm împotriva acestor tulpini virale au fost bine tolerate și au indus un răspuns imun umoral optim. (Feldman RA, 2019)

Rabia constituie o boală zoonotică prevenibilă prin vaccinare, prezentă în mai mult de 150 de țări, care poate determina moartea a zeci de mii de pacienți infectați anual, în special pe teritoriul african și pe cel asiatic. Aproximativ

40% din pacienții infectați sunt copii cu vârste mai mici de 15 ani. Odată apărute simptomele rabiei, decesul este aproape o certitudine, de aceea orice mușcătură potențial infectantă trebuie tratată cu celeritate inclusiv prin administrarea vaccinului antirabic. (WHO, 2020)

În ceea ce privește studiile clinice împotriva virusului rabic, au fost cercetate două formule de vaccin bazat pe tehnica ARNm, ambele în fază I, cu scop profilactic, efectuate pe 53, respectiv pe 101 participanți sănătoși. Unul dintre studii a durat cinci ani, între octombrie 2013 și februarie 2018, iar cel de al doilea, început în octombrie 2018 este încă în desfășurare și va fi finalizat în anul 2023. Autorii au demonstrat că vaccinarea profilactică cu vaccin ARNm împotriva rabiei induce o producție de anticorpi funcțională și stabilă împotriva antigenului viral, în situația în care administrarea prin injecție se face folosindu-se un dispozitiv fără ac. Urmărirea apariției reacțiilor adverse în urma administrării vaccinului a conturat un profil de siguranță bun. (Alberer M, 2017)

Citomegalovirusul este comun tuturor categoriilor de vârstă și se estimează că până la vârsta de 40 de ani, jumătate dintre adulți au fost infectați. Totuși, nu toate persoanele infectate dezvoltă boala în mod normal, cei mai afectați fiind nou-născuții. Citomegalovirusul se numără printre cele mai frecvente surse de infecții congenitale, infecția neonatală ridicând importante probleme de sănătate, cea mai frecventă fiind pierderea auzului. (CDC, 2020)

Pentru profilaxia infecției cu citomegalovirus au fost studiate două formule vaccinale folosind tehnica ARNm, unul dintre studii desfășurându-se între 2017 și 2020, iar cel de al doilea, început în decembrie 2019, fiind încă în desfășurare. Numărul de participanți incluși a fost semnificativ, 181, respectiv 452 de adulți sănătoși, rezultatele nefiind încă disponibile.

Începând cu anul 2004 virusul Chikungunya s-a răspândit pe noi teritorii cauzând o problemă globală și având un potențial epidemic semnificativ. Acest virus a cauzat milioane de infectări până în prezent, însă nu au fost descoperite nici terapia etiologică antivirală, nici metoda profilactică prin vaccinare eficace. (Silva LA, 2017)

Trialul clinic de fază I desfășurat între ianuarie 2019 și iunie 2021 pentru profilaxia

infecției cu virusul Chikungunya a inclus 39 de adulți sănătoși, iar rezultatele sunt indisponibile. (*clinicaltrials.gov*)

Începând de la finalul anului 2019 și până în prezent pandemia cu noul coronavirus a cauzat mai mult de 135 446 500 de infecții confirmate și peste 2 927 900 decese, afectând 223 de țări sau teritorii de pe tot globul. (WHO, 2021)

Pentru profilaxia infecției cu noul coronavirus au fost desfășurate mai multe studii clinice care au cercetat formule vaccinale bazate pe tehnica ARNm. În martie 2020 a fost început un studiu clinic intervențional de fază 1, care include 120 de adulți sănătoși. Vaccinul ARNm a indus un răspuns imun optim în cazul tuturor participanților și nu au fost identificate limitări ale studiului legate de siguranța administrării. Reacțiile adverse au fost majoritar ușoare sau moderate. Doza de 100μg a indus un titru crescut de anticorpi neutralizanți, comparativ cu doza de 25μg, ceea ce susține derularea unui studiu de fază 3 folosind doza de 100μg. (Anderson BR, 2020; Jackson LA, 2020)

În iulie 2020 a fost început studiul clinic de fază 3, care include 30.420 de adulți sănătoși.

Alt studiu clinic de fază I, II și III, care include 43998 de adulți sănătoși a fost început în aprilie 2020.

În prezent există două vaccinuri ARNm aprobate de EMA (European Medicines Agency) pentru profilaxia infecției cu Sars-Cov-2 (*clinicaltrials.gov*) vaccinul produs de Pfizer-BioNTech (Comirnaty) și vaccinul Moderna, produs de compania americana cu același nume.

Concluzii

Deși preocuparea descoperirii de noi tehnici de fabricare a vaccinurilor pe baza de ARNm datează de peste 20 de ani, în cazul gripei, rabiei, infecției cu citomegalovirus, Chikungunya, aceasta s-a concretizat și pus în practică abia la sfârșitul anului 2020, atunci când pandemia cu SARS-COV 2 a creat condițiile necesare. Acestea sunt legate de urgentarea studiilor clinice, de aprobarea utilizării vaccinurilor bazate pe aceste noi tehnologii, asigurarea transportului corespunzător respectând temperaturile mici de păstrare/ depozitare și nu în ultimul rând resursele financiare necesare pentru derularea tuturor acestora, astfel încât populația să poată beneficia de aceste produse imunobio-

logice într-un timp cât mai scurt. Dezbateră legată de rapiditatea dezvoltării acestor noi vaccinuri continuă nefundamentat în ciuda tuturor acestor evidențe care demonstrează că de fapt ideea nu este deloc nouă și nu este deloc netestată, (supunând populația unui risc major) ci este o idee revoluționară care a demonstrat că printr-un efort colectiv se poate produce un vaccin cu un profil de siguranță bun, eficient și care în plus poate să performeze, asigurându-se necesarul de vaccinuri într-un timp scurt chiar și în situația apariției unor noi variante ale coronavirusului.

Bibliografie

- [1] Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, et al. (2017) Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet*. 390:1511–20. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3
- [2] Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, Gottardo R, Bica MA, Garofano A, Koch SD, Fotin-Mleczek M, Hoerr I, Clemens R, von Sonnenburg F. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet*. 2017 Sep 23; 390(10101): 1511-1520. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28754494.
- [3] Anderson BR, Muramatsu H, Nallagatla SR, Bevilacqua PC, Sansing LH, Weissman D, et al. Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. *Nucleic Acids Res*. (2010) 38:5884–92. doi: 10.1093/nar/gkq347
- [4] Anderson EJ, Roupael NG, Widge AT, Jackson LA, Roberts PC, Makhene M, Chappell JD, Denison MR, Stevens LJ, Pruijssers AJ, McDermott AB, Flach B, Lin BC, Doria-Rose NA, O'Dell S, Schmidt SD, Corbett KS, Swanson PA 2nd, Padilla M, Neuzil KM, Bennett H, Leav B, Makowski M, Albert J, Cross K, Edara VV, Floyd K, Suthar MS, Martinez DR, Baric R, Buchanan W, Luke CJ, Phadke VK, Rostad CA, Ledgerwood JE, Graham BS, Beigel JH; mRNA-1273 Study Group. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med*. 2020 Dec 17; 383(25): 2427-2438. doi: 10.1056/NEJMoa2028436. Epub 2020 Sep 29. PMID: 32991794; PMCID: PMC7556339.
- [5] Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T. . (2015) N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J Control Release* 217:337–44. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.051
- [6] Baitsch L, Baumgaertner P, Devevre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, et al. Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest*. (2011) 121:2350–60. doi: 10.1172/JCI46102
- [7] Brazzoli M, Magini D, Bonci A, Buccato S, Giovani C, Kratzer R, et al. (2016) Induction of broad-based immunity and protective efficacy by self-amplifying mRNA vaccines encoding influenza virus hemagglutinin. *J Virol*. 90:332–44. doi: 10.1128/JVI.01786-15
- [8] Centers for Disease Control and Prevention (2020, august). Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. Preluat de la: <https://www.cdc.gov/cmV/overview.html>
- [9] Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, McPartlan JS, Tsosie JK, Tilley LD, et al. (2016) Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113:E4133–42. doi: 10.1073/pnas.1600299113
- [10] clinicaltrials.gov
- [11] Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. (2014) Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 14:135–146. doi: 10.1038/nrc3670
- [12] Cuzick J. Preventive therapy for cancer. *Lancet Oncol*. (2017) 18:e472–e482. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30536-3
- [13] Feldman RA, Fuhr R, Smolenov I, Mick Ribeiro A, Panther L, Watson M, Senn JJ, Smith M, Almarsson Ö, Pujar HS, Laska ME, Thompson J, Zaks T, Ciaramella G. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials. *Vaccine*. 2019 May 31;37(25):3326-3334. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.074. Epub 2019 May 10. PMID
- [14] Fiedler K, Lazzaro S, Lutz J, Rauch S,

- Heidenreich R. (2016) mRNA Cancer Vaccines. *Recent Results Cancer Res.* 209:61–85. doi: 10.1007/978-3-319-42934-2_5
- [15] Fleeton MN, Chen M, Berglund P, Rhodes G, Parker SE, Murphy M, et al. (2001) Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. *J Infect Dis.* [23] 183:1395–8. doi: 10.1086/319857
- [16] Hollister K, Chen Y, Wang S, Wu H, Mondal A, Clegg N, et al. (2014) The role of follicular helper T cells and the germinal center in HIV-1 gp120 DNA prime and gp120 protein boost vaccination. *Hum Vaccin Immunother.* 10:1985–92. doi: 10.4161/hv.28659 [24]
- [17] Iavarone CT, O'Hagan D, Yu D, Delahaye NF, Ulmer JB. (2017) Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 16:871–81. doi: 10.1080/14760584.2017.1355245
- [18] Jackson LA, Anderson EJ, Roupheal NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, McCullough MP, Chappell JD, Denison MR, Stevens LJ, Pruijssers AJ, McDermott A, Flach B, Doria-Rose NA, Corbett KS, Morabito KM, O'Dell S, Schmidt SD, Swanson PA 2nd, Padilla M, Mascola JR, Neuzil KM, Bennett H, Sun W, Peters E, Makowski M, Albert J, Cross K, Buchanan W, Pikaart-Tautges R, Ledgerwood JE, Graham BS, Beigel JH; mRNA-1273 Study Group. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report. *N Engl J Med.* Nov 12;383(20):1920-1931. doi: 10.1056/NEJMoa2022483. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32663912; PMCID: PMC7377258.
- [19] Kariko K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. (2011) Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* 39:e142. doi: 10.1093/nar/gkr695 [25]
- [20] Lents MP, Barbosa LP, Santana ALA, Pinheiro EEG, Mugabe LC, Biscarde CEA, et al. (2018) Immunocastration of goats using anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine. *Theriogenology.* 114:7–13. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.03.013 [26]
- [21] Li B, Fang L, Xu Z, Liu S, Gao J, Jiang Y, et al. (2009) Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Emerg Infect Dis.* 15:2032–5. doi: 10.3201/eid1512.090390 [27]
- [22] Li J, Arevalo MT, Chen Y, Chen S, Zeng M. (2014) T-cell-mediated cross-strain protective immunity elicited by prime-boost vaccination with a live attenuated influenza vaccine. *Int J Infect Dis.* 27:37–43. doi: 10.1016/j.ijid.2014.05.0165. Scheibelhofer S, Thalhamer J, Weiss R. DNA and mRNA vaccination against allergies. *Pediatr Allergy Immunol.* 29:679–88. doi: 10.1111/pai.12964
- [23] Magini D, Giovani C, Mangiavheterosacchi S, Maccari S, Cecchi R, Ulmer JB, et al. Self-A (2018) mplifying mRNA vaccines expressing multiple conserved influenza antigens confer protection against homologous and untypical viral challenge. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0161193. doi: 10.1371/journal.pone.0161193
- [24] Meyer M, Huang E, Yuzhakov O, Ramanathan P, Ciaramella G, Bukreyev A. Modified mRNA-based vaccines elicit robust immune responses and protect guinea pigs from ebola virus disease. *J Infect Dis.* 217:451–55. doi: 10.1093/infdis/jix592
- [25] Pardi N, Muramatsu H, Weissman D, Kariko K. (2013) In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides. *Methods Mol Biol.* 969:29–42. doi: 10.1007/978-1-62703-260-5_2
- [26] Pardi N, Weissman D. (2017) Nucleoside Modified mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Methods Mol Biol.* 1499:109–21. doi: 10.1007/978-1-4939-6481-9_6
- [27] Pardi N, Parkhouse K, Kirkpatrick E, McMahon M, Zost SJ, Mui BL, et al. (2018) Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies. *Nat Commun.* 9:3361. doi: 10.1038/s41467-018-05482-0
- [28] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. (2018) mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 17:261–79. doi: 10.1038/nrd.2017.243
- [29] Pascolo S. Vaccination with messenger RNA. (2006) *Methods Mol Med.* 127:23–40.
- [30] Probst J, Weide B, Scheel B, Pichler BJ, Hoerr I, Rammensee HG, et al. (2007) Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther.* 14:1175–80. doi: 10.1038/sj.gt.3302964
- [31] Pulido MR, Sobrino F, Borrego B, Saiz M. (2010) RNA immunization can protect mice against foot-and-mouth disease virus. *Antiviral Res.* 85:556–8. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.12.005
- [32] Rauch S, Jasny E, Schmidt KE, Petsch B. (2018)

- New vaccine technologies to combat outbreak situations. *Front Immunol.* 9:1963. doi: 10.3389/fimmu.2018.01963 [43]
- [33] Ross J. (1995) mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev*59:423–50. [44]
- [34] Sahin U, Kariko K, Tureci O. (2014) mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 13:759–80. doi: 10.1038/nrd4278 [45]
- [35] Saxena S, Sonwane AA, Dahiya SS, Patel CL, Saini M, Rai A, et al. (2009) Induction of immune responses and protection in mice against rabies using a self-replicating RNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein. *Vet Microbiol*136:36–44. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.030 [46]
- [36] Scorza FB, Pardi N. (2018) New kids on the block: RNA-based influenza virus vaccines. *Vaccines.* 6:pii: E20. doi: 10.3390/vaccines6020020 [47]
- [37] Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest.* 2017 Mar 1;127(3):737-749. doi: 10.1172/JCI84417. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28248203; PMCID: PMC5330729. [48]
- [38] Stitz L, Vogel A, Schnee M, Voss D, Rauch S, Mutzke T, et al. (2017) A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies. *PLoS Negl Trop Dis.* 11:e0006108. doi: 10.1371/journal.pntd.0006108 [49]
- [39] Su S, Bi Y, Wong G, Gray GC, Gao GF, Li S. 2015, *Epidemiology, Evolution, and Recent Outbreaks of Avian Influenza Virus in China.* *J Virol.*; 89(17):8671-8676. doi:10.1128/JVI.01034-15 [50]
- [40] VanBlargan LA, Himansu S, Foreman BM, Ebel GD, Pierson TC, Diamond MS. (2018) An mRNA Vaccine protects mice against multiple tick-transmitted flavivirus infections. *Cell Rep.* 25:3382–3392 e3. doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.082
- [41] Van Gulck ER, Ponsaerts P, Heyndrickx L, Vereecken K, Moerman F, De Roo A, et al. (2006) Efficient stimulation of HIV-1-specific T cells using dendritic cells electroporated with mRNA encoding autologous HIV-1 Gag and Env proteins. *Blood.* 107:1818–27. doi: 10.1182/blood-2005-01-0339
- [42] Weissman D, Pardi N, Muramatsu H, Kariko K. HPLC purification of in vitro transcribed long RNA. *Methods Mol Biol.* (2013) 969:43–54. doi: 10.1007/978-1-62703-260-5_3
- Weissman D. mRNA transcript therapy. *Expert Rev Vaccines.* (2015) 14:265–81. doi: 10.1586/14760584.2015.973859
- World Health Organization (2020, aprilie). Rabies. Preluat de la: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>.
- World Health Organization (2021). Avian influenza A(H7N9) virus. Preluat de la: https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/en/
- World Health Organization (2021, aprilie). Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Preluat de la: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* (1990) 247:1465–8.
- Wu NC, Zost SJ, Thompson AJ, Oyen D, Nycholat CM, McBride R, et al. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine. *PLoS Pathog.* (2017) 13:e1006682. doi: 10.1371/journal.ppat.1006682
- Zhou B, Meliopoulos VA, Wang W, Lin X, Stucker KM, Halpin RA, et al. (2016) Wentworth. reversion of cold-adapted live attenuated influenza vaccine into a pathogenic virus. *J Virol.* 90:8454–63. doi: 10.1128/JVI.00163-16
- Zost SJ, Parkhouse K, Gumina ME, Kim K, Diaz Perez S, Wilson PC, et al. (2017) Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114:12578–83. doi: 10.1073/pnas.1712377114

Contribuția autorilor: conceptualizare: EMC; designul cercetării: EMC, ACC validarea metodologiei EMC; culegerea datelor EMC, CAI; analiza datelor și / sau interpretarea datelor: EMC, CAI; scriere-pregătirea textului inițial EMC; revizuire și editare: ACC

Conflict de interese: Nu există conflict de interese